



Title	ラット皮膚創傷治癒課程におけるオートファジーマーカーLC3の免疫組織学的解析(本文)
Author(s)	浅井, 笑子
Citation	
Issue Date	2014-03-25
URL	http://ir.fmu.ac.jp/dspace/handle/123456789/604
Rights	Fulltext: Published version is "Fukushima J Med Sci. 2018 Apr 17;64(1):15-22. doi: 10.5387/fms.2016-13", used under CC BY-NC-SA 4.0
DOI	
Text Version	ETD

ラット皮膚創傷治癒過程におけるオートファジー マーカー LC3 の免疫組織学的解析

形成外科学講座

浅井 笑子

研究要旨

創傷治癒は組織・細胞レベルにおいて極めて変化に富む再建過程を伴う。一方、オートファジーは飢餓ストレス等で誘導される細胞内分解システムの一つで、細胞の恒常性維持に必須である。本研究ではこれら 2 つの現象の関連性を探るため、ラット創傷治癒モデルにおけるオートファジーマーカー、microtubule-associated protein light chain 3 (MAP1LC3 ; 以後 LC3 と表記) の局在様式とその変化、および臨床応用されている basic fibroblast growth factor (bFGF) の影響を調べた。まず始めに、創傷治癒過程における LC3-II 量をウェスタンブロット法により解析したが顕著な変化は見られなかった。次に、LC3 に対する抗体を用いて免疫組織蛍光法を行った結果、創作製後 2-7 日の創組織において LC3 陽性顆粒は線維芽細胞と一部の筋線維芽細胞に認められた。しかし、マクロファージにはほとんど認められなかった。これら LC3 陽性顆粒の一部はオートファジー隔離膜マーカーである Atg16L と共局在を示し、一方電子顕微鏡法では創傷部線維芽細胞に典型的なオートファゴソームを認めた。創傷後治癒過程において、線維芽細胞当たりの LC3 陽性顆粒数の変化を定量解析した結果、増殖期後半でピークを示した。また、創組織内では創中央部より創縁部の線維芽細胞により多く認められた。さらに、bFGF 投与の影響を調べた結果、創作製後 7 日目において創中心部細胞の LC3 陽性顆粒数は創縁部細胞と同程度まで増加した。以上の結果より、皮膚創傷治癒過程ではオートファジーが線維芽細胞の機能変化に応じて何らかの役割を有することが示唆された。

緒言

創傷治癒過程は組織・細胞レベルにおいて極めて変化に富む再生・再建過程を含み、一般に炎症期、増殖期、リモデリング期に大別される [1]。炎症期では、血小板、フィブリンによる速やかな止血、創面保護作用に続き、サイトカインや増殖因子の作用によりマクロファージ、リンパ球などの血球系細胞が浸潤し、変性組織の処理が進む。次の増殖期では、皮膚欠損部を充填する肉芽組織の形成と血管新生が進行する。この時期には増殖因子やサイトカインに線維芽細胞が反応し、活発に遊走・増殖するとともにタイプ III コラーゲンを産生する。さらに血管新生が亢進する結果、肉芽組織が形成される。リモデリング期では肉芽組織形成時に産生されたタイプ III コラーゲンからタイプ I コラーゲンへの置換、線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化、および同細胞による創収縮が進行しつつ上皮化が進行し、治癒に至る。しかし、ヒトではさらに上皮化後も瘢痕内のリモデリングが長く続くことが知られている。このように創傷治癒過程には複雑なプロセスが関わり、これが異常を来すと、難治性創傷や異常瘢痕などの病態を呈する。現在、臨床的治療法として線維芽細胞の増殖を促す塩基性線維芽細胞増殖因子 bFGF 製剤が応用されている。bFGF は治癒過程の促進のみならず、瘢痕部の硬化を抑制し柔軟に保つ効果があると報告されている [2]。

一方、オートファジー・リソソーム分解系（以下オートファジーと表記）は飢餓などのストレスにより誘導される細胞内分解システムの一つであり、細胞内膜系の新生および動的変化を伴う（図 1）。すなわち、オートファジーシグナルにより隔離膜という扁平な二重膜構造が生成し、これがオルガネラを含む細胞質成分を囲むことでオートファゴソームという約 0.5-1 μm 径の小胞を形成する。これが酸性加水分解酵素を含むリソソームと融合することでオートリソソームとなり、内容物を分解して低分子のアミノ酸を放出、再利用すると考えられている [3]。現在、オートファジー現象には 30 を超えるオートファジー関連遺伝子群 autophagy-related gene (Atg) が関与することが判明している。例えば Atg12-5-16L 複合体

は隔離膜に局在し、隔離膜が閉じてオートファゴソームが形成されると遊離する。また、Atg8の哺乳類ホモログであるLC3は、LC3-IとLC3-IIの2タイプが存在する。オートファジーが惹起されるとAtg7, Atg3, Atg12-5-16Lの作用により細胞質に存在するLC3-Iとフォスファチジルエタノールアミンとの共有結合反応が進み、LC3-IIとして隔離膜へ局在化する。そしてオートファゴソーム形成後には細胞質に面する膜に局在するものはAtg4による切断を受けて細胞質に遊離し、内腔に面した膜に局在するものはリソソーム酵素により分解される(図1)。それゆえLC3-IIの増加は、隔離膜およびオートファゴソームの増加と相関し、オートファジーマーカーとして形態学および生化学的な検出に利用されている[4]。

近年、オートファジーは神経変性疾患 [5-8]、癌 [9-10]、感染症 [11-13]、代謝性疾患 [10、14-16]、炎症性疾患[17]など、様々な病態に関与することが明らかとなり、その制御機構に関する研究が進んでいる[18]。しかし、皮膚の創傷治癒過程に関しては熱傷後の治癒過程に対してオートファジーが促進的に働くとする報告[19]があるものの、全層皮膚欠損創の治癒過程に関する報告はない。そこで本研究では、ラット創傷治癒モデルにおいてオートファジーマーカーであるLC3の局在動態を解析し、創傷治癒過程におけるオートファジーの関与を検討した。

材料と方法

1) 創作製および標本採取

7 週令雄ウィスターラット(日本クレア)をエーテル麻酔後、ペントバルビタール(0.1 mg/100 g weight、ソムノペンチル[®]、共立製薬、Japan)を腹腔内投与した。背部を剃毛後、バイオブシーパンチ(Kai medical、Japan)を用いて径 10 mm の円形全層皮膚欠損創(皮筋を含めて切除)を 3 か所作製した[20]。創部作製後、6 時間後、および 2、5、7、9、14 日目にラットを同様に麻酔し、1 か所の創について潰瘍面全体および創縁から約 2mm の周囲皮膚領域を合わせて切り出した。さらに創周囲皮膚領域の上皮部分を切除した後、液体窒素で急速凍結し、生化学的解析用サンプルとして保存した。残りの創部については、ラットを 4%スクロース-4%パラホルムアルデヒド-0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.4)により左心室から灌流固定し、創部と創縁から約 2mm の皮膚領域を合わせて切り出した後、同固定液で一晩浸漬固定した。定法によりパラフィン包埋または OCT コンパウンドによる凍結包埋を行った。尚、14 日目に関してはすでに上皮化しており、肉眼的に見て毛の欠損部を瘢痕組織ととらえて採取した。創作製後の 6 時点についてそれぞれ 3 匹のラット(合計 18 匹)を使用した。

bFGF(フィブラストスプレー[®]: 科研製薬、Japan)の投与実験に関しては、20 mm の円形創を 2 か所メスにて作製し、一方の潰瘍面に 2 回/day 噴霧し(bFGF 投与側)、他方には噴霧せず(対照側)に 7 日目に同様の処理を行った。合計で 3 匹のラットを使用した。

本研究は福島県立医科大学の動物実験委員会の承認を得て行った。

2) ウェスタンブロット解析

タンパク分解酵素阻害剤(complete EDTA free Protease inhibitor cocktail tablets: Roche Diagnostics、USA)およびホスファターゼ阻害剤(Phosphatase inhibitor Cocktail 2/3: SIGMA-ALDRICH、Japan)を含む組織抽出液(100 mM Tris-HCl 緩衝液 [pH7.6]、150

mM NaCl、5% glycerol、1% TritonX-100、5 mM EDTA)に凍結組織を入れ、ポリロンホモゲナイザーを用いて破碎した。3000 rpm (800 g)、4°Cで 10 分遠心後、上清について BCA Protein Assay kit (Pierce®: Thermo Scientific、USA)を用いてタンパク濃度を測定した。1 レーンあたり約 8 µg のタンパク質を 4-20%グラジエントゲル (Wako、Japan)を用いた SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で展開し、さらにニトロセルロース膜 (Hybound - C Extra: GE Healthcare、Japan)に転写した。一次抗体を用いて免疫反応を行った後、SuperSignal (Thermo Scientific、USA)を用いて化学発光反応させ、ImageQuant LAS4000 mini (GE Healthcare、Japan)により検出した。

3) 免疫組織蛍光法

ミクロトーム (RM2245: LEICA、Germany)によりパラフィン包埋ブロックから 5 µm 厚の切片を作製した。また、凍結標本ブロックからはクライオスタット (CM3050 S: LEICA、Germany)を用いて 10 µm 厚の切片を作製した。パラフィン切片は脱パラフィン後、凍結切片は解凍後に TritonX-100 を含むリン酸緩衝生理食塩水 (0.1% TritonX-100、0.1 M リン酸緩衝液 [pH7.4]、150 mM NaCl)にて洗浄し、5%正常ヤギ血清を用いてブロッキング処理した後、一次抗体を 4°C、一晚反応させ、さらに Alexa Fluor 488 もしくは Alexa Fluor 594 で標識された二次抗体を反応させた。核染色には Hoechst33342 を用いた。水溶性封入剤 (Fluoromount: Diagnostic Bio Systems、USA)で封入後、共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000: Olympus、Japan)で観察した。約 1 µm の光学切片画像を Z 軸方向に 5-6 枚連続で取得し、これらを重ね合わせたものを最終的な画像とした。また、LC3 の免疫染色性を定量するために、創中心部、創縁部および創周囲皮膚領域において 212 x 212 µm の視野領域を無作為に(創周囲の皮膚領域においては、創部と接する領域は除いた)3 か所ずつ画像取得し、細

胞あたりの LC3 陽性顆粒数を算出した。統計学的有意差解析は Student' s-*t* 検定または Tukey-Kramer 法を用いた。

4) 電子顕微鏡観察

創作製後 5 日目にラットを麻酔後、2% グルタルアルデヒドと 2% パラホルムアルデヒドを含む 0.1 M リン酸緩衝液 [pH 7.4] で灌流固定した。創部を切り出した後、マイクロスライサーを用いて 0.2-0.5 mm の厚さにスライスした。さらに同じ固定液にて 4°C で一晩浸漬した。7.5% スクロースを含む 0.1 M リン酸緩衝液で 3 回洗浄した後、1% 四酸化オスミウムと 7.5% スクロースを含む 0.1 M リン酸緩衝液で 4°C、2 時間固定した。その後、定法によりアルコールで脱水し、Epon812 樹脂に包埋した。ウルトラミクローム (ULTRACUT UCT: LEICA、Germany) を用いて約 60 nm の超薄切片を作製し、酢酸ウラン溶液 (#219-00692: Wako、Japan) で 5 分間、さらに 0.25-0.3% のクエン酸鉛溶液で 5 分間処理した後に透過型電子顕微鏡 (JEM-1200EX: JEOL、Japan) で観察した。

6) 抗体

本研究で用いた抗体と希釈倍率は以下の通りである。

抗体の種類	クローン名・ カタログ番号	製造元	希釈倍率	
			ウェスタンブロット法	免疫組織蛍光法
抗 LC3 抗体	2057-1	EPITOMICS, USA	1:200	1:200
抗 LC3 抗体	PM046	MBL, Japan		1:500
抗 pMAPK 抗体	#9102	Cell Signaling, USA;	1:1000	
抗 ED1 抗体	MCA341R	Serotec, UK	1:1000	1:50
抗 α SMA 抗体	VP-S281	VECTOR, USA	1:1000	1:100
抗 P4H 抗体	AF5110-1	Acris, Germany	1:1000	1:1000
抗 Atg16L 抗体	IF12	MBL, Japan		1:500
抗 GAPDH 抗体	sc-32233	Santa Cruz Biotechnology, USA	1:1000	

(略語の説明)

pMAPK: リン酸化 MAP kinase、 α SMA: α smooth muscle actin、P4H: Prolyl-4-Hydroxylase

結果

ラットを用いた創傷治癒実験系の確立

本研究で用いたラット創傷治癒モデルにおける組織学的変化を確認する目的で、パラフィン組織切片を HE 染色により観察した。2 日目から欠損部が細胞外基質で補填され、5-9 日目には肉芽形成と創収縮が見られた(図 2A)。そして 14 日目には上皮化した。次に創傷治癒過程に関連する各種マーカー分子についてウェスタンブロット法で調べたところ(図 2B、D)、マクロファージマーカーである ED1 の反応性は創傷後 2、5 日目に強く、その後徐々に減少した。増殖シグナルを示す pMAPK は 2-9 日目で上昇を示し、線維芽細胞のマーカーである P4H は 2-7 日目に増加した。また、筋線維芽細胞マーカーである α SMA は 5-14 日目にかけて増加した。以上の結果から、本創傷治癒モデルにおいて、炎症期は 2-5 日目にピークを迎え、それに続く 2-9 日目が増殖期、5-14 日がリモデリング期に相当し、増殖期とリモデリング期は数日にわたりオーバーラップしていると考えられた。

創傷治癒過程における LC3-II の生化学的変動解析

創傷治癒過程におけるオートファジーの関与を調べるために LC3-II タンパク質の量的変化を、ウェスタンブロット法にて解析した(図 2C、D)。LC3-II は LC3-I に脂質が結合して生成されるため、その変化を確認するために LC3-I と LC3-II の比を計算したが、大きな変化としてとらえることができなかった。

免疫組織学的解析による LC3 陽性細胞の同定

生化学的解析では動的に変化する創傷治癒過程を時間空間的に解析することが困難なため、抗 LC3 抗体を用いて免疫組織学的解析を行った。細胞を同定するために、コラーゲン生合成に必要な酵素である P4H を線維芽細胞のマーカー [21]、 α SMA を筋線

線維芽細胞マーカー、およびED1を活性化マクロファージのマーカーとして二重免疫蛍光法を行った(図3)。創作製後2および9日目の肉芽組織を観察するとLC3は多くの細胞で顆粒状に検出され、陽性細胞のほとんどがP4H陽性の線維芽細胞であった。創作製後5および7日目では α SMA陽性の筋線維芽細胞の一部にも顆粒状のLC3免疫反応が認められた。一方、創作製後2日目ではED1陽性細胞には明らかなLC3陽性顆粒は認められなかった。

線維芽細胞におけるLC3陽性顆粒の一部がオートファジー隔離膜であることを確認するために、隔離膜マーカーであるAtg16Lとの二重免疫蛍光法を行った。図4A、Bに示すようににカップ状のLC3陽性シグナルの一部はAtg16Lと一致していた。一方、創作製後5日目の創縁付近を電子顕微鏡にて観察したところ、図4C、Dに示すように、典型的なオートファゴソームが線維芽細胞に認められた。

以上の結果は、創傷治癒過程で見られるLC3陽性顆粒が主に線維芽細胞や一部の筋線維芽細胞に局在することを示し、オートファジー現象がこれら細胞機能と関連する可能性を示唆する。従って以後は線維芽細胞と筋線維芽細胞に焦点を絞って解析を進めた。

創傷治癒過程におけるLC3陽性顆粒数の部位別変化

LC3陽性顆粒の創組織内分布を調べる目的で、創作製後7日目における創組織を創縁部、創中心部および創周囲皮膚領域に分け(図5A)、各部位における線維芽細胞当たりのLC3陽性顆粒数を定量した。その結果、創縁部の線維芽細胞は創中心部の細胞よりもLC3陽性顆粒が多い傾向にあった(図5B、C)。創傷治癒過程の各時点において領域別にLC3陽性顆粒数を定量したところ、図5D、Eに示すように創縁部では創作製後7日目に最も高かった。一方、創中心部では6時間目と2日目に創周囲皮膚領域と比べてやや高く、5、7日目で一旦下がるが9日目に増加しピークを示した。また、創縁部と創中心部を比較すると6時

間と2日では有意差はなかったが、5、7、9日目では創縁部の線維芽細胞は創中心部の細胞よりも、それぞれ5倍、8倍、1.5倍程度、有意に高かった。また、対照として測定した創周囲皮膚領域の線維芽細胞は7、9日目で上昇し、9日目では創縁の細胞よりも高い値を示した。14日目になると創部および創周囲皮膚領域の両方で顆粒数は6時間、2日、5日の創周囲皮膚領域のレベルまで低下した。

bFGF 投与の影響

bFGF の LC3 陽性顆粒数に対する影響を検討するため、20 mm 径の円形創作製後に bFGF を投与した側と対照側に分け、LC3 と α SMA に対する抗体を用いて二重免疫組織蛍光法を行った。まず、 α SMA のシグナルは bFGF 投与側では創縁部、創中心部ともに対照側より明らかに減少していた(図 6A-D)。bFGF は線維芽細胞における α SMA 発現を抑制することが報告されているため[22]、この結果は本実験モデルにおいて bFGF が創内の線維芽細胞に作用していることを示す。次に細胞あたりの LC3 陽性顆粒数を定量した所、対照側では創中心部より創縁部の方が約 2.9 倍多く($p < 0.01$; 図 6E)、前述した 10 mm 径の円形創作製モデルにおける結果(図 5D、E)を再現できた。一方、投与側の創中心部における LC3 顆粒数は対照側の同部位より約 3.7 倍多く($p < 0.01$)、投与側の創縁部と同程度であった。

考察

創傷治癒過程におけるオートファジーの関与について

本研究では、ラット創傷治癒過程におけるオートファジーの関与について、オートファゴソームマーカーであるLC3を指標として解析した。特に、免疫組織学的解析によりLC3陽性顆粒が線維芽細胞および一部の筋線維芽細胞に認められ、その数が増殖期後半に多く、しかも創中心部よりも創縁部で多いことを明らかにした。また、LC3顆粒数は創周囲の皮膚領域においても創傷治癒過程後期に顕著に増加することを見出した。さらに創傷治癒促進剤であるbFGF投与により、創中心部の線維芽細胞でLC3顆粒数が有意に増加した。これら結果から、オートファジーが線維芽細胞機能と関連して創傷治癒過程に関わることが示唆された。最近、Xiaoらはオートファジーを活性化させることにより、2度熱傷ラットモデルにおける治癒期間が短縮すると報告した[19]。ここでは抗菌剤として開発されたrapamycinを用いているが、この薬剤は、mammalian target of rapamycin (mTOR) というキナーゼを阻害することによりオートファジーを亢進する薬剤としても知られている。おそらく全層皮膚欠損創モデルにおいても同様の効果が得られる可能性があり、今後はrapamycinを含めたオートファジーの制御薬剤を応用して、その効果を調べる必要があるだろう。

線維芽細胞の機能に関連したオートファジー

次に線維芽細胞におけるLC3顆粒の増加の意義について考察する。創傷治癒過程で出現する線維芽細胞の由来は、周囲からの遊走、骨髄や血管周囲細胞の動員などさまざまであるが、多くは周囲の結合組織から遊走してくることが分かっている[23]。創面に移動してきた増殖期の線維芽細胞は移動を止め、増殖しながら、盛んにコラーゲンを産生し欠損空間を補填するとともに、一部は筋線維芽細胞に分化して自身のストレスファイバー(α SMA)を介して創の収縮に寄与する[24]。さらに、組織の補填と上皮化が進行してくると、役割を終

えた細胞は細胞死によって創傷面より減少、消失する [25]。すなわち、創傷組織において線維芽細胞は細胞移動、細胞増殖、コラーゲン産生、筋線維芽細胞への分化、細胞死などの現象を経ており、これらにオートファジーが関わっている可能性がある(図 7 参照)。

細胞移動への関与については、最近の Tuloup-Minguez らの報告が興味深い。著者らはマウス胎児線維芽細胞 Mouse Embryonic Fibroblasts (MEF) やヒト子宮頸がん由来の HeLa 細胞でオートファジーを抑制すると、 $\beta 1$ integrin の membrane recycling が促進し、細胞遊走能を亢進させることを示した【26】。この現象が *in vivo* でも起きるならば、創傷部に移動してきた線維芽細胞は移動を停止する必要があり、オートファジーの活性上昇がこの現象に関わる可能性は十分考えられる(図 7-①)。本研究で見出した創縁部の線維芽細胞における LC3 陽性顆粒の増加はこの仮説を支持するものと考えられる。

本研究では、LC3 陽性顆粒は筋線維芽細胞の一部にも認められた。また創中心部の線維芽細胞における数は創作製後 5 日目から徐々に増加し 9 日目でピークとなり、創縁部の数に近づいた。コラーゲン産生を終了した線維芽細胞は筋線維芽細胞に分化することが知られているため、この変化は線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化を反映するものと推測される。おそらく、分化の過程で起きる細胞内タンパク質の大規模な分解と新生にオートファジーが作用しているのだろう(図 7-②)。

一方、オートファジーの細胞増殖への関与に関しては、否定的な報告が多い。まず増殖シグナルの多くは mTOR を活性化するため、オートファジーは抑制される傾向にある。実際、bFGF により線維芽細胞を刺激するとオートファジーが抑制されることが最近報告された[27]。しかし、本研究では bFGF 投与により細胞増殖を刺激した結果、創中心部の線維芽細胞において LC3 陽性顆粒が有意に増加した。この矛盾点を明確に説明することはできないが、いくつか考慮すべき観点がある。まず、培養細胞と生体を用いた実験系の違いが挙げられる。MEF を用いた実験では bFGF 投与後 2 時間でオートファジーが抑制され、その効果はお

そらく継続的である。しかし創作製後 7 日目の創中心部では、本来であれば筋線維芽細胞への分化シグナルが活性化される条件下で、同時に bFGF による増殖シグナルが作用している状態と考えられる [21、23、28]。特に今回の創傷治癒モデルでは最終の bFGF 投与から 5-6 時間後に組織を採取しているため、増殖と分化シグナルの優先度が変化している状態と考えられ、これがオートファジーを誘導している可能性がある(図 7-③)。したがって、今後は創組織における bFGF 投与後のオートファジー活性の推移を調査する必要があるだろう。また、後述するように bFGF の投与実験においても autophagy flux を解析して実際にオートファジーが亢進しているのか、あるいはリソソーム分解が抑制されている状態かを明確に示すてはならない。

最近、IL-2 により誘導される MEF の増殖にオートファジーが必要であるとの報告があるが[29]、その根拠はオートファジー阻害剤の投与、あるいはオートファジー関連遺伝子である ATG5 や beclin 1 の発現低下によるアポトーシス誘導によるものであり、この場合はオートファジーは増殖というよりは生存に必須であることを示唆している。

また本研究では対照として測定した創周囲の皮膚の線維芽細胞で LC3 顆粒の増加が認められた。その増加は創傷治癒過程の後期に起こり、瘢痕治癒とともに速やかに消失する経過を辿った。この時期の創周囲領域における線維芽細胞の反応として、創内で起きている細胞増殖、分化、移動、コラーゲン産生能の変化などは考えがたい。創傷部近傍に存在することで創傷部からの増殖因子 [30] やサイトカインの影響、そして創傷部の収縮に伴う張力が影響している可能性やこれら外界刺激に対応する恒常性維持機構としてオートファジーが機能しているなどの可能性が考えられるが、これらに関しても今後さらなる検討が必要である。

本研究で用いた方法論の問題点と解決法について

一般的に、ウェスタンブロット法による LC3-II や免疫組織学的な LC3 顆粒数の増加は、必ずしもオートファジー活性の亢進を示すものではない[31][32]。例えばリソソーム分解が抑制されると LC3 は分解されずにオートリソソームに蓄積し、また、オートファゴソームとリソソームの融合不全があっても LC3 顆粒が蓄積する。従って、LC3 顆粒の増加は、オートファジー活性の亢進、オートファジー過程の抑制、リソソーム分解抑制のどれか、あるいはこれら複数の要因を反映するものと考えられる。オートファジー活性の亢進を主張するためには autophagy flux を止める実験、例えば本動物実験系に阻害剤等を用いてリソソーム分解抑制操作を加え、その期間における LC3-II の有意な上昇を示す必要がある。また、将来的に隔離膜、オートファゴソーム、オートリソソームに対する別のマーカーを用いて LC3 顆粒の詳細な同定を行い、各構造の割合を調べる必要があると考えられる。

今回はオートファジーの指標として線維芽細胞における LC3 陽性顆粒数の変化を報告したが、ウェスタンブロット法で検出した LC3-II 量は創傷治癒過程で明らかな変化を示さなかった。理由として、生化学的解析では表皮細胞、血管内皮細胞、その他の炎症性細胞や創周囲の皮膚領域の細胞などを分離できないために、これら細胞群の LC3 を検出している可能性が考えられる。特に組織学的解析から創周囲皮膚領域の線維芽細胞における LC3 陽性顆粒は無視できないレベルと考えられた。また、血管内皮細胞に関しては、2007 年の Roy らによる報告が興味深い。彼らは褥創など慢性創傷の患者の血管組織をレーザーマイクロダイセクションにより採取し、マイクロアレイ解析することによって発現変化している遺伝子群を抽出した[33]。高発現を示す遺伝子としてオートファジー関連遺伝子である Atg4 が含まれており補足データとして公開されている。論文中での詳細解析はなされていないが、今後は創傷部血管におけるオートファジーの動態も検討する必要があるだろう。その他、今後の実験においては採取部位の特定法や抽出条件の改良が必要と考えている。

将来の展望

近年、オートファジーは飢餓状態におけるアミノ酸供給を目的とした細胞内大規模分解（すなわち非選択的分解）だけでなく、細胞内の不要成分を処理し再利用するための選択的オートファジーという機能が存在することが分かってきた [34]。例えばユビキチン凝集体（aggrephagy）や機能不全のミトコンドリア（mitophagy）、あるいは細菌（xenophagy）などを選択的に分解することにより生体防御戦略の一部をなしている。創傷治癒に関わる線維芽細胞は外環境に応じた大きな変化、すなわち細胞のリノベーション [35] を強いられていることから、ここにオートファジー・リソソーム分解系が関与することは十分考えられる。本研究が進展し、線維芽細胞に関わる組織治癒機構の解明および慢性創傷や異常瘢痕などの病態機構の解明がなされれば、新たな治療の糸口につながることを期待される。

謝辞

本論文の作成にあたり、終始適切な助言を賜り、また丁寧に指導して下さいました福島県立医科大学 解剖組織学講座 和栗 聡教授、山本 雅哉准教授、福島県立医科大学 形成外科学講座 上田 和毅教授に謹んで感謝の意を表します。また、研究を支えていただいた福島県立医科大学 解剖組織学講座の方々に深く感謝致します。

Refference

- [1] Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT.
Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008;453: 314–21
- [2] Akita S, Akino K, Imaizumi T, Tanaka K, Anraku K, Yano H, Hirano A. The Quality of Pediatric Burn Scars Is Improved by Early Administration of Basic Fibroblast Growth Factor. *J Burn Care Res*. 2006 May-Jun ;27(3) :333-8
- [3] Duszenko M, Ginger ML, Brennand A, Gualdrón-López M, Colombo MI, Coombs GH, Coppens I, Jayabalasingham B, Langsley G, de Castro SL, Menna-Barreto R, Mottram JC, Navarro M, Rigden DJ, Romano PS, Stoka V, Turk B, Michels PA. Autophagy in protists. *Autophagy*. 2011 Feb;7(2):127-58
- [4] Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2011 Nov10;27:107-32
- [5] Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H, Mizushima N. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative diseases in mice. *Nature*. 2006;441:885-889.
- [6] Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*. 2006;441:880-884.

- [7] Komatsu M, Wang QJ, Holstein GR, Friedrich VL Jr, Iwata J, Kominami E, Chait BT, Tanaka K, Yue Z. Essential role for autophagy protein Atg7 in the maintenance of axonal homeostasis and the prevention of axonal degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104:14489-14494.
- [8] Fimia GM, Stoykova A, Romagnoli A, Giunta L, Di Bartolomeo S, Nardacci R, Corazzari M, Fuoco C, Ucar A, Schwartz P, Gruss P, Piacentini M, Chowdhury K, Cecconi F. Ambra 1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature*. 2007;447:1121-5
- [9] Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E. Role of autophagy in cancer. *Nature Rev Cancer*. 2007;7:961-967.
- [10] Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*. 2008;132:27-42.
- [11] Levine B. Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense. *Cell*. 2005;120:159–162.
- [12] Levine B, Deretic V. Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nature Rev Immunol*. 2007;7:767–777.
- [13] Schmid D, Münz C. Innate and adaptive immunity through autophagy. *Immunity*. 2007; 27:11–21.

- [14] Rajat Singh, Susmita Kaushik, Yongjun Wang, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, Tanaka K, Cuervo AM, Czaja MJ. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature*. 2009;458 ,1131-1135.
- [15] Yang, L., Li, P., Fu, S., et al. Calay ES, Hotamisligil GS. Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance. *Cell Metab*. 2010 11,467–478.
- [16] Ebato, C, Uchida T, Arakawa M, Komatsu M, Ueno T, Komiya K, Azuma K, Hirose T, Tanaka K, Kominami E, Kawamori R, Fujitani Y, Watada H. Autophagy is important in islet homeostasis and Compensatory increase of β cellmass in response to high-fat diet. *Cell Metab*. 2008 8,325–332.
- [17] Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature*. 2011 Jan 20;469(7330):323-35
- [18] Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*. 2008 Feb 28;451(7182):1069-75
- [19] Xiao M, Li L, Hu Q, Ma L, Liu L, Chu W, Zhang H. Rapamycin reduces burn wound progression by enhancing autophagy in deep second-degree burn in rats. *Wound Repair Regen*. 2013 Aug 23.
- [20] Akasaka Y, Ono I, Yamashita T, Jimbow K, Ishii T. Basic fibroblast growth factor promotes apoptosis and suppresses granulation tissue formation in acute incisional wounds. *J Pathol*. 2004 Jun;203(2):710-20

- [21] Bai Y, Muragaki Y, Obata K, Iwata K, Ooshima A. Immunological properties of monoclonal antibodies to human and rat prolyl 4-hydroxylase. *J Biochem.* 1986 Jun; 99(6): 1563-70.
- [22] Ishiguro S, Akasaka Y, Kiguchi H, Suzuki T, Imaizumi R, Ishikawa Y, Ito K, Ishii T. Basic fibroblast growth factor induces down-regulation of α -smooth muscle actin and reduction of myofibroblast areas in open skin wounds. *Wound Rep Reg.* 2009 17:617-625
- [23] Higashiyama R, Nakao S, Shibusawa Y, Ishikawa O, Moro T, Mikami K, Fukumitsu H, Ueda Y, Minakawa K, Tabata Y, Bou-Gharios G, Inagaki Y. Differential contribution of dermal resident and bone marrow-derived cells to collagen production during wound healing and fibrogenesis in mice. *J Invest Dermatol.* 2011; 131:529-36
- [24] Hinz B. The myofibroblast: paradigm for a mechanically active cell. *J Biomech.* 2010;43: 146–55.
- [25] Desmoulière A, Redard M, Darby IA, Gabbiani G. Apoptosis mediate the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol.* 1995; 146:55–66.
- [26] Tuloup-Minguez V, Hamaï A, Greffard A, Nicolas V, Codogno P, Botti J. Autophagy modulates cell migration and β 1 integrin membrane recycling. *Cell Cycle.* 2013 Oct 15;12(20):3317-28.

- [27] Lin X, Zhang Y, Liu L, McKeehan WL, Shen Y, Song S, Wang F. FRS2 α is essential for the fibroblast growth factor to regulate the mTOR pathway and autophagy in mouse embryonic fibroblasts. *Int J Biol Sci*. 2011;7(8):1114-21.
- [28] Maltseva O, Folger P, Zekaria D, Petridou S, Masur SK. Fibroblast growth factor reversal of the corneal myofibroblast phenotype. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001 Oct; 42(11):2490-5
- [29] Kang R, Tang D, Lotze MT, Zeh III HJ. Autophagy is required for IL-2-mediated fibroblast growth. *Exp Cell Res*. 2013 Feb 15;319(4):556-65
- [30] He, C., and Klionsky, D.J. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu. Rev. Genet*. 2009 43:67–93.
- [31] Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell*. 2010. 140:313-326.
- [32] Tanida I, Minenatsu-Ikeguchi N, Ueno T, Kominami E. Lysosomal Turnover, but Not a Cellular Level, of Endogenous LC3 is a Marker for Autophagy. *Autophagy*. 2005;1:2:84-91
- [33] Roy S, Patel D, Khanna S, Gordillo GM, Biswas S, Friedman A, Sen CK. Transcriptome-wide analysis of blood vessels laser captured from human skin and chronic wound-edge tissue. *PNAS* 2007 104(36):14472-14477
- [34] Reggiori F, Komatsu M, Finley K and Simonsen A. Autophagy: More Than a Nonselective Pathway *Int.J. Cell. Biol*. 2012, 18pages

[35] Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*. 2011 Nov 11;147(4):728-4

付図説明

図 1 オートファジー・リソソーム分解系と LC3 局在

細胞質内に隔離膜 (isolation membrane) と呼ばれる二重膜構造が出現し、タンパク質やオルガネラを含む細胞質部分を取り囲む (isolation membrane あるいは phagophore)。隔離膜が閉じるとオートファゴソーム (autophagosome) となり、さらにここにリソソーム (lysosome) が融合することによって加水分解酵素が供給され、オートリソソーム (autolysosome) となる。オートファジーが惹起されると細胞質拡散型の LC3-I はフォスファチジルエタノールアミン (PE) と結合して LC3-II となり (青丸)、隔離膜に局在する。オートファゴソーム二重膜の内側膜に結合したものはリソソーム酵素で分解され、外側膜に結合したものは Atg4 により切断を受け細胞質に遊離する。一方、Atg12-Atg5-Atg16L 複合体 (ピンク丸) は隔離膜に局在するが、閉じてオートファゴソームが完成すると膜から解離する。矢印は LC3 および Atg16L がマーカーとなる対象構造の範囲を示す。

図 2 本研究で用いたラット創傷治癒モデルと LC3-II の発現変化

(A) 正常皮膚 (control) および創作製後 6 時間 (6h)、2、5、7、9、14 日目 (各々 2、5、7、9、14d) の HE 染色像を示す。これら組織像およびウェスタンブロット法による各種マーカー発現パターン (B) に基づいて、創傷治癒過程の各期間 (inflammatory phase、proliferation phase、remodeling phase) を判断し左に示す。*: 創面、M: 皮筋、s: 瘢痕面

(B、C、D) ラット正常皮膚 (control、C) および創作製後 6 時間 (6h)、2、5、7、9、14 日目 (各々 2、5、7、9、14d) における創傷部組織の抽出液を調整し、ウェスタンブロット法により ED1、pMAPK (p42 and p44)、P4H、 α SMA、GAPDH (B) および LC3-I と LC3-II (C) の発現変化を調べた。(D) にその値を定量化し、GAPDH で除したものをグラフ化して示す。LC3-I と LC3-II のバンド位置の指標として、通常環境下で飼育したラットの肝臓抽出液 (cont)

および 24 時間飢餓状態においたもの(st)を左に示す。一次抗体反応には抗 LC3 抗体 (2057-1)を使用した。kD: 分子量

図 3 LC3 陽性細胞の同定

各時期(2、5、7、9 日後)における創傷部固定組織について凍結切片を作製し、抗 LC3 抗体(PM046、赤)と以下のマーカー抗体を用いて二重免疫蛍光法を行った: 抗 P4H 抗体(A、緑)、抗 α SMA 抗体(B、緑)、および抗 ED1 抗体(C、緑)。それぞれ四角枠部位の拡大を inset に、マージ像を最右側に示す。Scale bar: 10 μ m

図 4 LC3 と Atg16L の二重免疫蛍光法および電子顕微鏡解析

(A、B)創作製後 7 日後における創傷部固定組織についてパラフィン切片を作製し、抗 LC3 抗体(2057-1、赤)と抗 Atg16L 抗体(緑)を用いて二重免疫蛍光法を行った。2 視野を示し、それぞれ矢印の構造を拡大して inset に示す。各染色シグナルおよびヘキスト染色(青、核染色)とのマージ像を最右側に示す。Scale bar: 5 μ m

(C、D)創作製後 5 日目における創傷部固定組織についてエポン樹脂包埋切片を作製し、電子顕微鏡で観察した。コラーゲン細線維に囲まれ、粗面小胞体が発達した線維芽細胞を認める。C の四角枠を拡大して D に、D の四角枠を拡大して inset に示す。矢印はオートファゴゾームを示す。Scale bar: C; 1 μ m、D; 200 nm

図 5 創傷治癒過程における LC3 陽性顆粒数の部位別変化

(A)は創周囲皮膚領域(periwound skin)、創中心部(center)、創縁部(margin)がどの部分を指すかを示す。

(B、C)創作製後 6 時間(6h)、2、5、7、9、14 日目(各々2、5、7、9、14d)における固定組織についてパラフィン切片を作製し、抗 LC3 抗体(2057-1、赤)を用いて免疫蛍光法を行った。創作製後 7 日目における創中心部 (B)および創縁部 (C) の LC3 染色像をヘキスト染色(青、核染色)と共に示す。Scale bar: 10 μ m

(D)各時点の創周囲皮膚領域(白)、創中心部 (灰色)および創縁部 (黒)領域について、細胞あたりの LC3 陽性顆粒数をプロットした (mean \pm SD)。創作製後 14 日目のみ、創中心部と創縁部を統合して表示した(#)。有意差を示した検定結果のみ“*”で示す($p < 0.01$ 、Student's t test)。

(E) LC3 陽性顆粒数の時間変化を折れ線グラフに示す。各部位において、5 日目とそれ以外の時点を比較し有意差検定を行った。創作製後 14 日目のみ、創中心部と創縁部を統合して表示した(#)。有意差を示した検定結果のみ“*”で示す($p < 0.05$ 、Tukey-Kramer test)

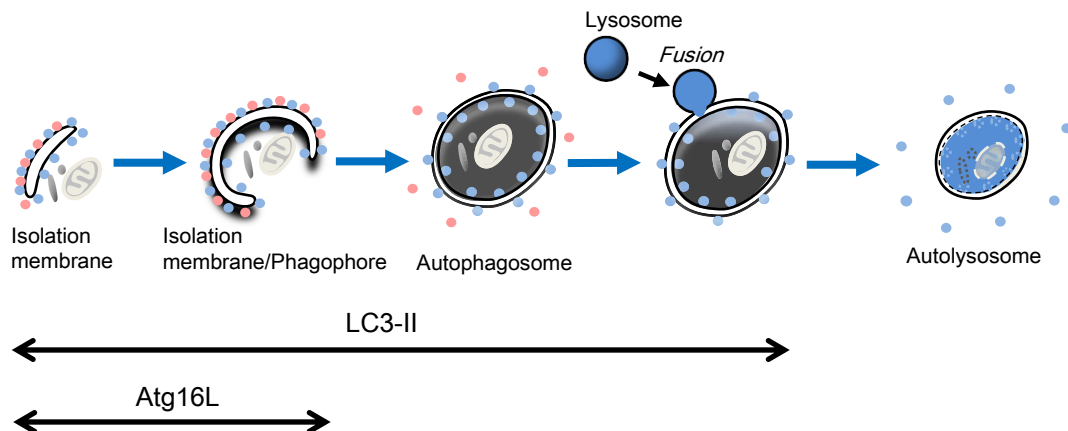
図 6 bFGF 投与による LC3 分布への影響

(A-D)創作製後 bFGF 塗布した側 (C、D)と塗布しない側 (A、B) に分け、7 日目の創傷部固定組織についてパラフィン切片を作製し、抗 LC3 抗体(2057-1、赤)と抗 α SMA 抗体(緑)を用いて二重免疫蛍光法を行った。創中心部 (A、C) および創縁部 (B、D)の例を図示し、最右側にはマージ画像をヘキスト染色(青、核染色)と共に示す。四角枠部分の拡大を inset に示す。Scale bar: 20 μ m

(E) 創中心部(灰色)および創縁部(黒)における LC3 顆粒数 (mean \pm SD)を示す。有意差を示した検定結果のみ“*”で示す($p < 0.01$ 、Student's t test)

図 7 創傷治癒過程における線維芽細胞の機能変化に対応したオートファジーの関与

創傷治癒過程では、線維芽細胞の様々な機能変化が時間空間的に起こる。本研究結果および過去の文献から、オートファジーが線維芽細胞の移動停止(①)、筋線維芽細胞への分化(②)、および増殖・分化シグナルの優先度の変化(③)に関与することが推測される。青丸は LC3 顆粒を示す。



- LC3-PE (LC3-II)
- Atg12-Atg5-Atg16L complex

図1 オートファジー・リソソーム分解系とLC3局在

細胞質内に隔離膜 (isolation membrane) と呼ばれる二重膜構造が出現し、タンパク質やオルガネラを含む細胞質部分を取り囲む (isolation membrane あるいは phagophore)。隔離膜が閉じるとオートファゴゾーム (autophagosome) となり、さらにここにリソソーム (lysosome) が融合することによって加水分解酵素が供給され、オートリソソーム (autolysosome) となる。オートファジーが惹起されると細胞質拡散型の LC3-I はフォスファチジルエタノールアミン (PE) と結合して LC3-II となり (青丸)、隔離膜に局在する。オートファゴゾーム二重膜の内側膜に結合したものはリソソーム酵素で分解され、外側膜に結合したものは Atg4 により切断を受け細胞質に遊離する。一方、Atg12-Atg5-Atg16L 複合体 (ピンク丸) は隔離膜に局在するが、閉じてオートファゴゾームが完成すると膜から解離する。矢印は LC3 および Atg16L がマーカーとなる対象構造の範囲を示す。

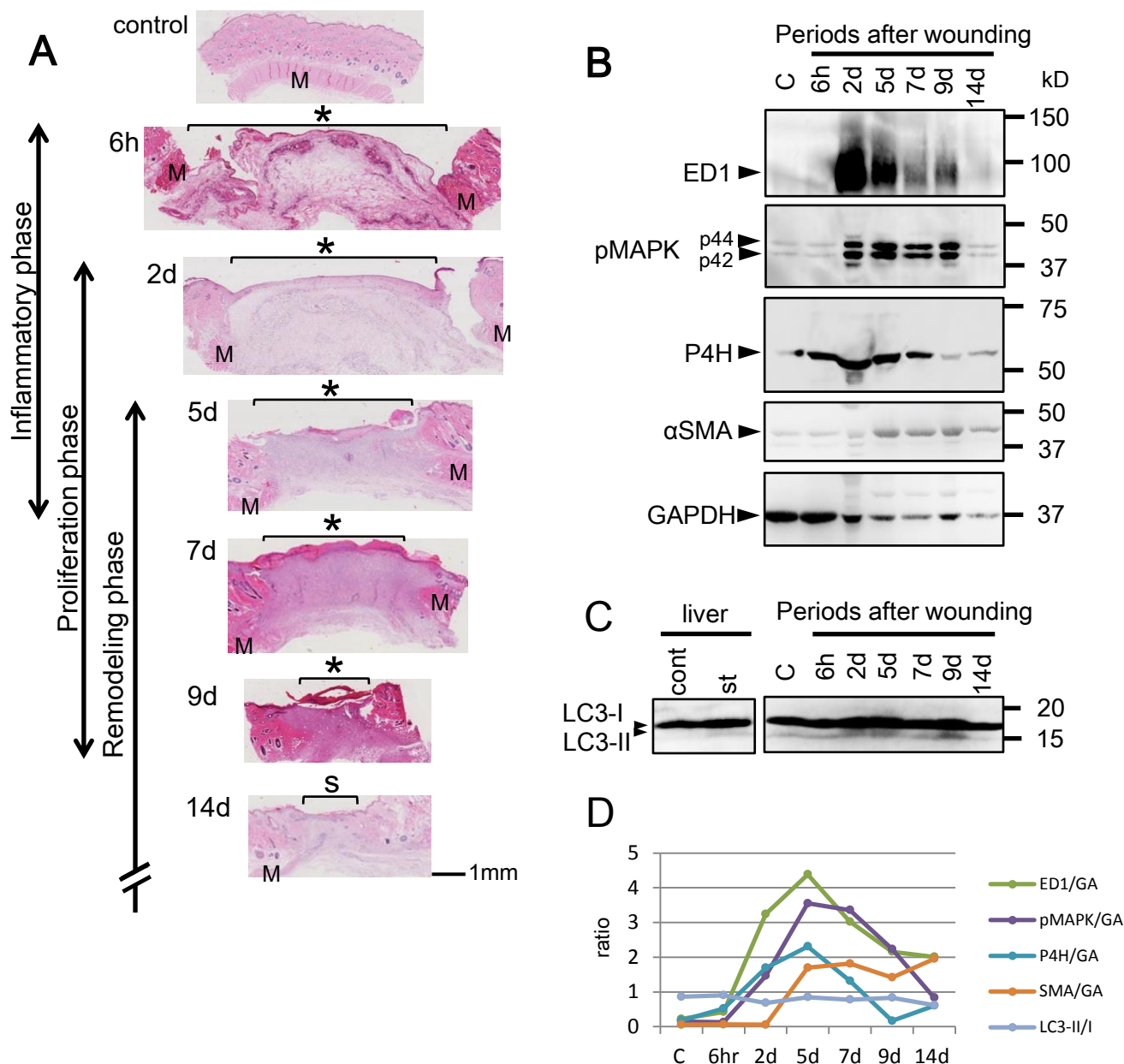


図2 本研究で用いたラット創傷治癒モデルとLC3-IIの発現変化

(A) 正常皮膚(control)および創作製後6時間(6h)、2、5、7、9、14日目(各々2、5、7、9、14d)のHE染色像を示す。これら組織像およびウエスタンブロット法による各種マーカー発現パターン(B)に基づいて、創傷治癒過程の各期間(inflammatory phase、proliferation phase、remodeling phase)を判断し左に示す。

* : 創面、M: 皮筋、s: 癒痕面

(B、C、D) ラット正常皮膚(control、C)および創作製後6時間(6h)、2、5、7、9、14日目(各々2、5、7、9、14d)における創傷部組織の抽出液を調整し、ウエスタンブロット法によりED1、pMAPK (p42 and p44)、P4H、αSMA、GAPDH (B)およびLC3-IとLC3-II (C)の発現変化を調べた。(D)にその値を定量化し、GAPDHで除したものをグラフ化して示す。LC3-IとLC3-IIのバンド位置の指標として、通常環境下で飼育したラットの肝臓抽出液(cont)および24時間飢餓状態においたもの(st)を左に示す。一次抗体反応には抗LC3抗体(2057-1)を使用した。kD: 分子量

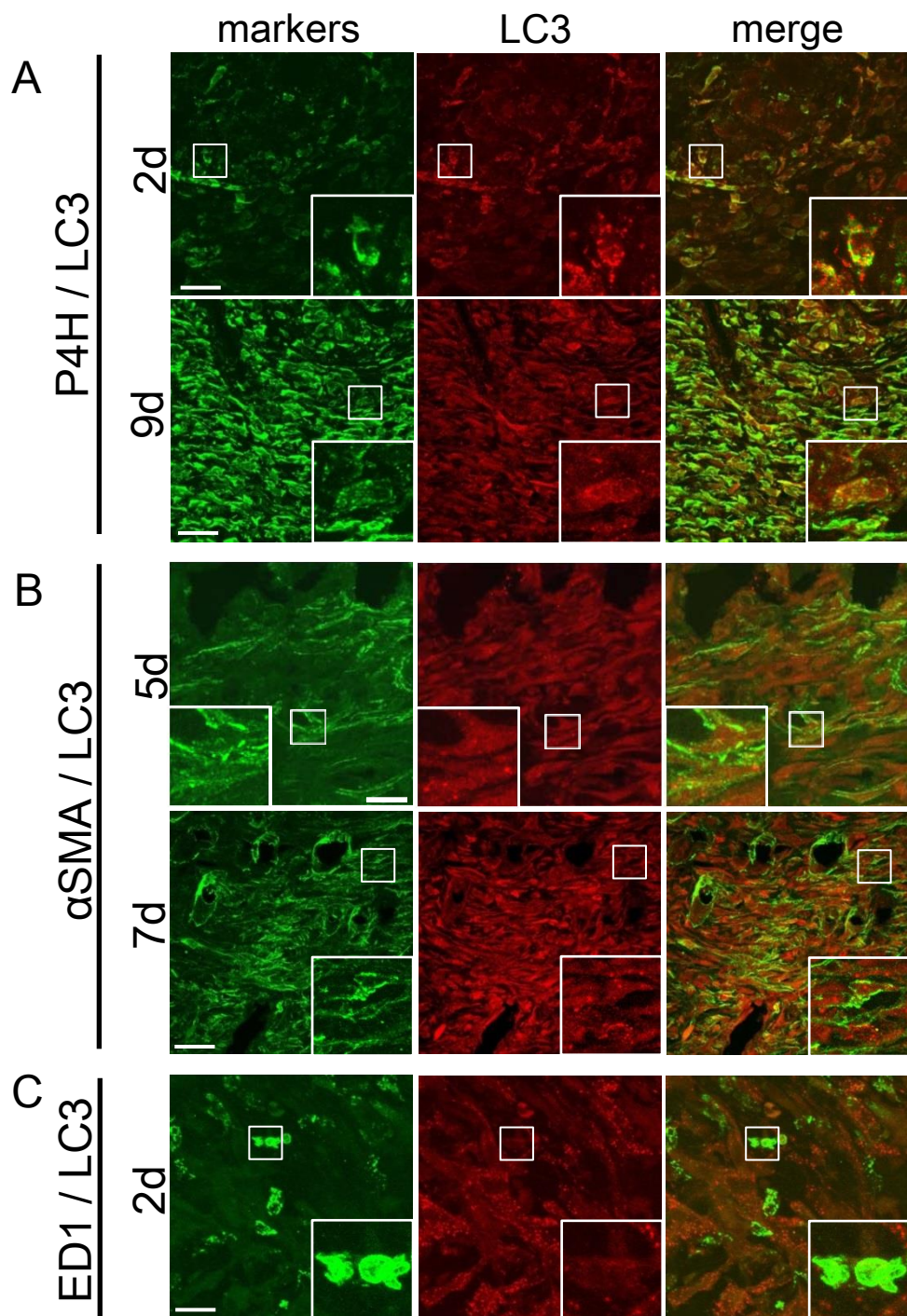


図3 LC3陽性細胞の同定

各時期(2、5、7、9日後)における創傷部固定組織について凍結切片を作製し、抗LC3抗体(PM046、赤)と以下のマーカー抗体を用いて二重免疫蛍光法を行った: 抗P4H抗体(A、緑)、抗 α SMA抗体(B、緑)、および抗ED1抗体(C、緑)。それぞれ四角枠部位の拡大をinsetに、マージ像を最右側に示す。Scale bar: 10 μ m

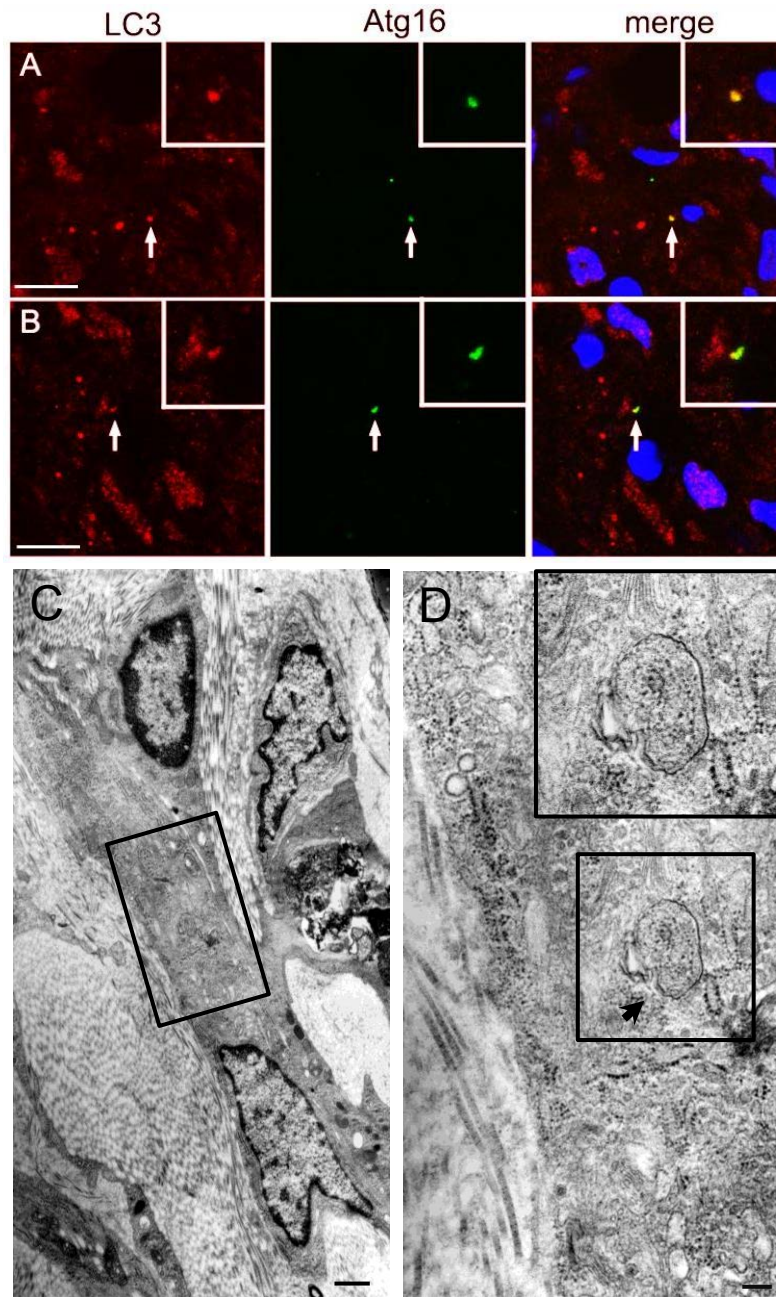


図4 LC3とAtg16Lの二重免疫蛍光法および電子顕微鏡解析

(A、B)創作製後7日後における創傷部固定組織についてパラフィン切片を作製し、抗LC3抗体(2057-1、赤)と抗Atg16L抗体(緑)を用いて二重免疫蛍光法を行った。2視野を示し、それぞれ矢印の構造を拡大してinsetに示す。各染色シグナルおよびヘキスト染色(青、核染色)とのマージ像を最右側に示す。Scale bar: 5 μ m

(C、D)創作製後5日目における創傷部固定組織についてエポン樹脂包埋切片を作製し、電子顕微鏡で観察した。コラーゲン細線維に囲まれ、粗面小胞体が発達した線維芽細胞を認める。Cの四角枠を拡大してDに、Dの四角枠を拡大してinsetに示す。矢印はオートファゴゾームを示す。Scale bar: C; 1 μ m、D; 200 nm

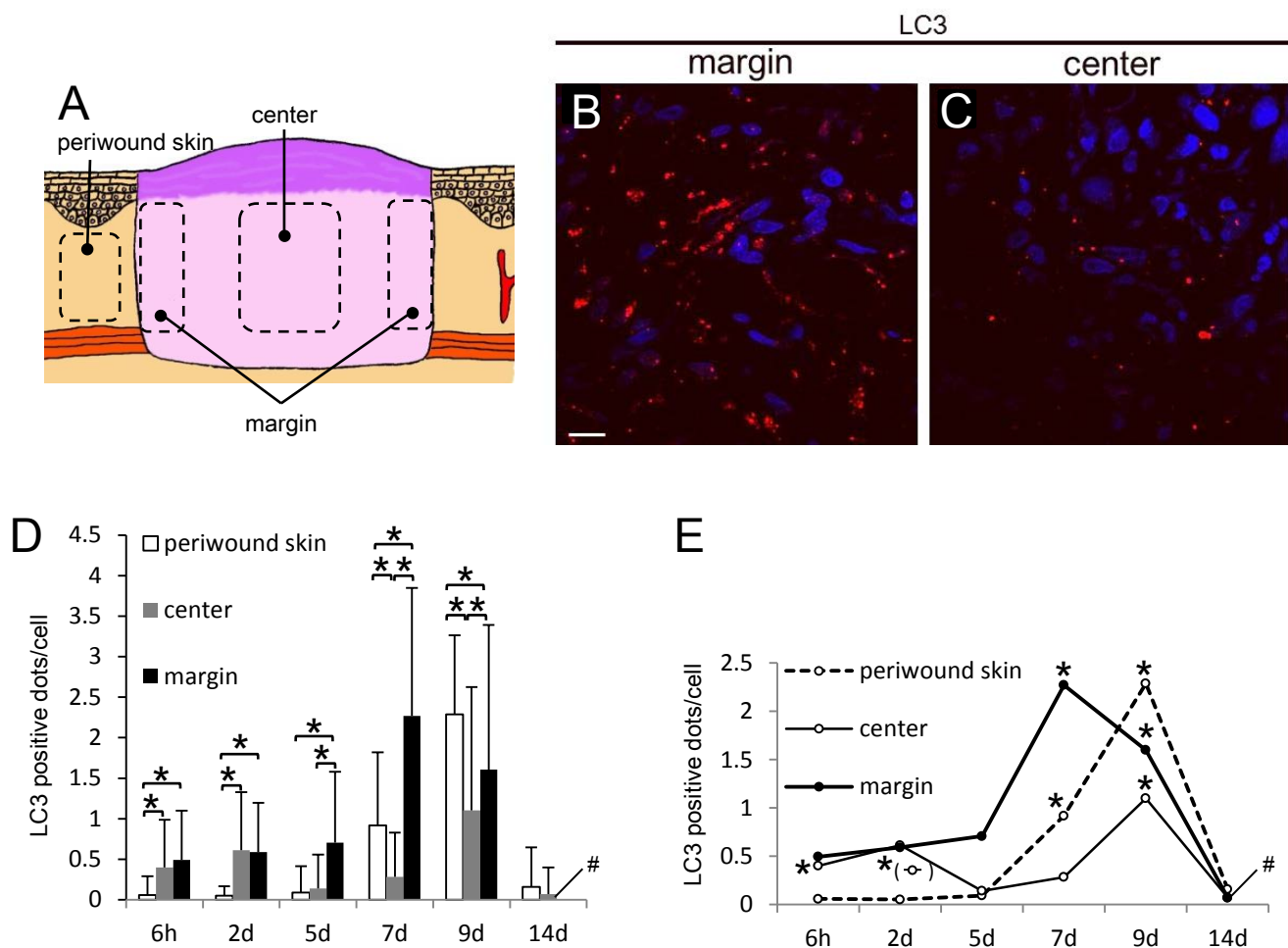


図5 創傷治癒過程におけるLC3陽性顆粒数の部位別変化

(A)は創周囲皮膚領域(periwound skin)、創中心部(center)、創縁部(margin)がどの部分を指すかを示す。

(B、C)創作製後6時間(6h)、2、5、7、9、14日目(各々2、5、7、9、14d)における固定組織についてパラフィン切片を作製し、抗LC3抗体(2057-1、赤)を用いて免疫蛍光法を行った。創作製後7日目における創中心部(B)および創縁部(C)のLC3染色像をヘキスト染色(青、核染色)と共に示す。Scale bar: 10 μ m

(D)各時点の創周囲皮膚領域(白)、創中心部(灰色)および創縁部(黒)領域について、細胞あたりのLC3陽性顆粒数をプロットした(mean \pm SD)。創作製後14日目のみ、創中心部と創縁部を統合して表示した(#)。有意差を示した検定結果のみ“*”で示す($p < 0.01$, Student's t test)。

(E) LC3陽性顆粒数の時間変化を折れ線グラフに示す。各部位において、5日目とそれ以外の時点を比較し有意差検定を行った。創作製後14日目のみ、創中心部と創縁部を統合して表示した(#)。有意差を示した検定結果のみ“*”で示す($p < 0.05$, Tukey-Kramer test)。

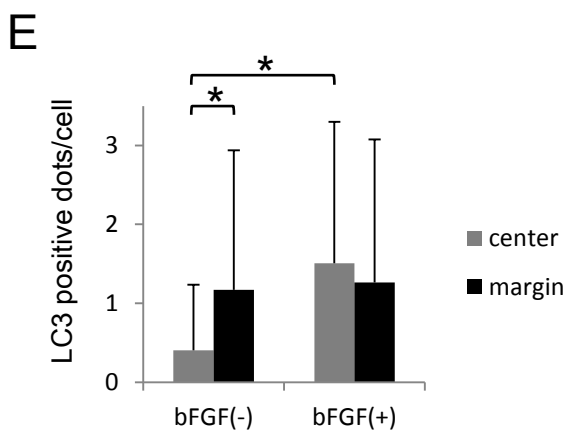
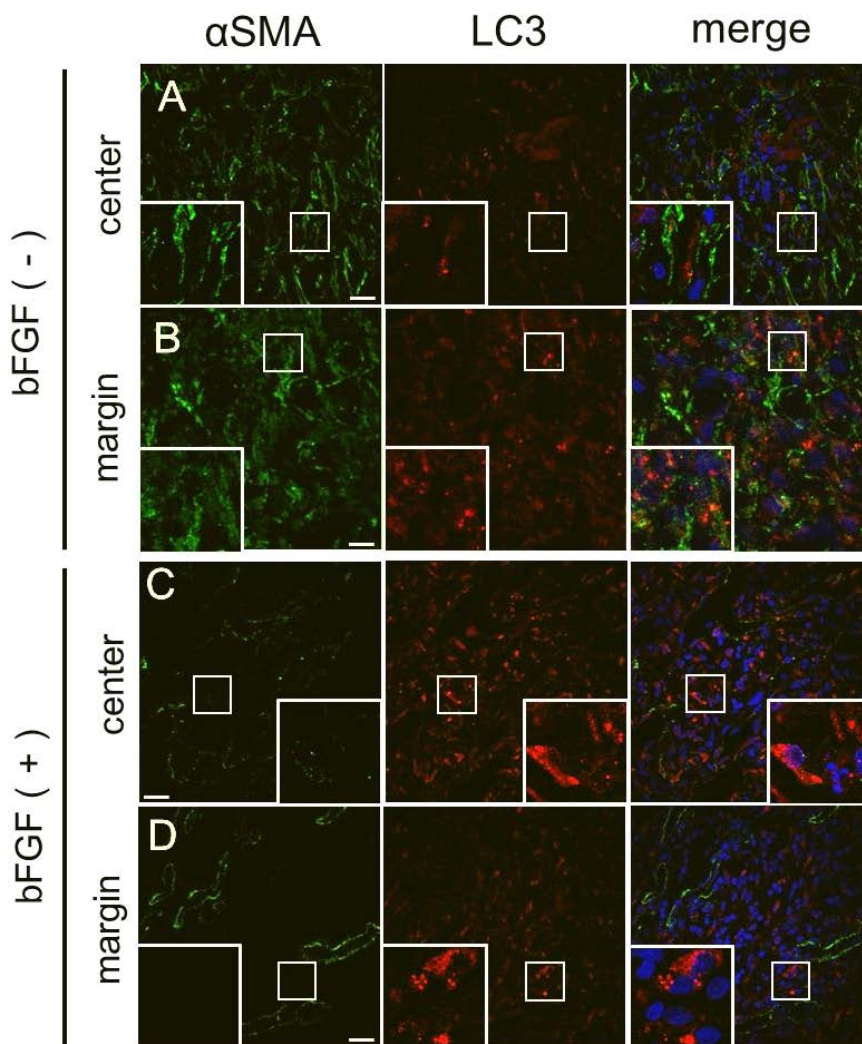


図6 bFGF投与によるLC3分布への影響

(A-D) 創作製後bFGF塗布した側 (C、D)と塗布しない側 (A、B) に分け、7日目の創傷部固定組織についてパラフィン切片を作製し、抗LC3抗体(2057-1、赤)と抗αSMA抗体(緑)を用いて二重免疫蛍光法を行った。創中心部 (A、C) および創縁部 (B、D) の例を図示し、最右側にはマージ画像をヘキスト染色(青、核染色)と共に示す。四角枠部分の拡大をinsetに示す。Scale bar: 20 μm

(E) 創中心部(灰色)および創縁部(黒)におけるLC3顆粒数 (mean ± SD)を示す。有意差を示した検定結果のみ“*”で示す (p < 0.01、Student's *t* test)。

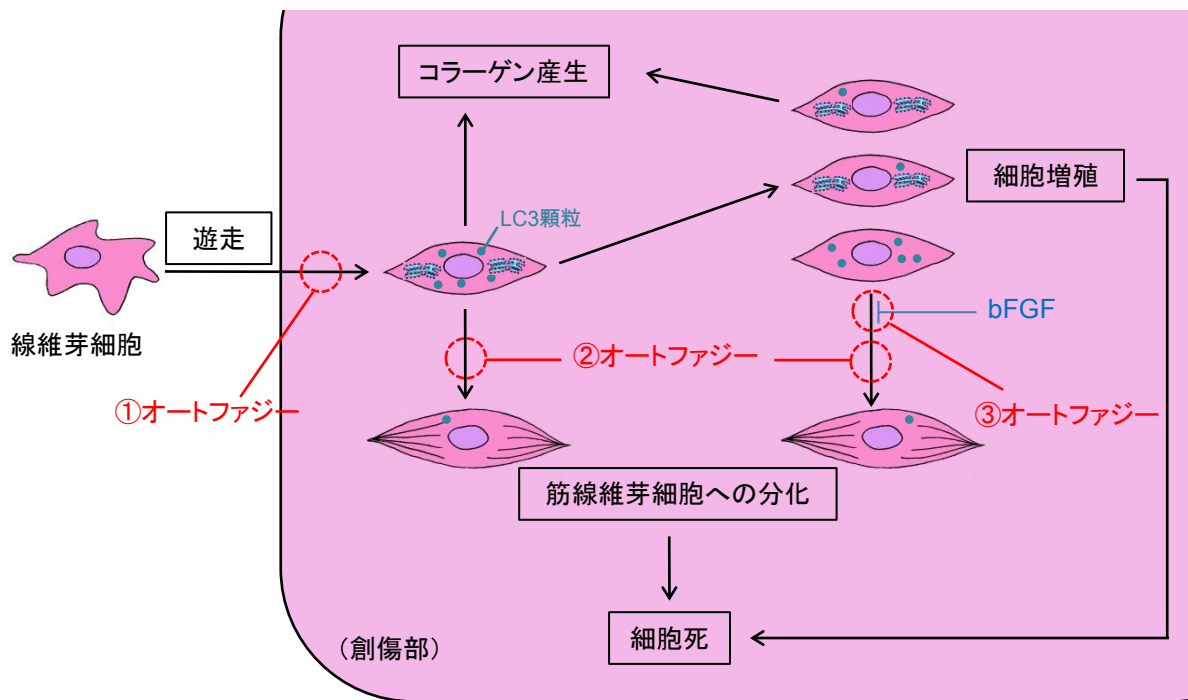


図7 創傷治癒過程における線維芽細胞の機能変化に対応したオートファジーの関与

創傷治癒過程では、線維芽細胞の様々な機能変化が時間空間的に起こる。本研究結果および過去の文献から、オートファジーが線維芽細胞の移動停止(①)、筋線維芽細胞への分化(②)、および増殖・分化シグナルの優先度の変化(③)に関与することが推測される。青丸はLC3顆粒を示す。